文章编号:1000-5404(2010)04-0369-03

论著

α-葡萄糖苷酶抑制剂 Radicamine A 的初步研究

刘春艳[1,2],孟爱国[3],詹 欢[2] (300072 天津,天津大学药物科学与技术学院药物化学教研室[1];063000 河北 唐山,华北煤炭医学院:药学系中药学科[2];附属医院检验科[3])

[摘要] **目的** 探讨 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用和对小肠葡萄糖吸收的影响。**方法** 建立 α-葡萄糖苷酶抑制模型,采用 α-葡萄糖苷酶抑制实验测定 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用;采用体外小肠外翻肠囊模型来测定 Radicamine A 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用。**结果** Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶抑制作用呈剂量依赖性,其 IC_{50} 为 2.27 mg/L,与拜糖平对 α-葡萄糖苷酶抑制作用相比较无显著性差异;且 Radicamine A 能明显抑制小肠对葡萄糖的吸收($P<0.01$),也呈剂量依赖性,其 IC_{50} 为 0.10 mg/ml。与拜糖平对小肠葡萄糖吸收的抑制作用相比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论** Radicamine A 能显著抑制小肠葡萄糖的吸收,有望成为一种治疗糖尿病的药物。

[关键词] Radicamine A;α-葡萄糖苷酶抑制剂;抑制作用;拜糖平

[中图法分类号] R965;R977.15 **[文献标志码]** A

Study on Radicamine A as a α-glucosidase inhibitor

Liu Chunyan[1,2], Meng Aiguo[3], Zhan Huan[2] ([1]School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin, 300072; [2]Department of Pharmacy, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei Province, 063000; [3]Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[Abstract] **Objective** To study the inhibitory effect of radicamine A on α-glucosidase and the glucose's absorption by small intestine. **Methods** Inhibitory effect of radicamine A was studied both in α-glucosidase inhibition experiments and by a valgus cyst model of small in testine *in vitro*. **Results** Radicamine A inhibited α-glucosidase and glucose's absorption in a dose-dependent manner ($P<0.01$) and its IC_{50} value was 2.27 mg/L and 0.10 mg/ml, respectively. No significant difference was observed in the inhibitory effects of acarbose and radicamine A on the glucose's absorption in small intestine. **Conclusion** Radicamine A can significantly inhibit the glucose absorption in small intestine and can thus be expected to become a novel drug of diabetes.

[Key words] Radicamine A; α-glucosidase inhibitor; inhibitory effect; acarbose

Corresponding author: Liu Chun-yan, E-mail:tangshan2002@yahoo.cn

α-葡萄糖苷酶抑制剂是一类新型口服降血糖药物,能竞争性抑制小肠内 α-葡萄糖苷酶的活性,延缓或抑制葡萄糖在肠道吸收,有效降低餐后高血糖[1]。近年来研究发现 α-葡萄糖苷酶抑制剂参与蛋白糖基化和脂类糖基化等过程,具有抗肿瘤、抗病毒、免疫刺激活性和抗动脉粥样硬化等作用[2,3],这引起了国内外学者极大的兴趣。

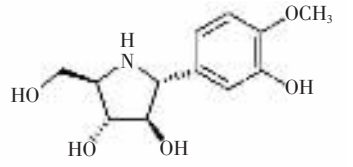
天然产物 Radicamines A 和 B 是从半边莲中分离到的两个新型吡咯烷型生物碱,发现他们是有效的 α-葡萄糖苷酶抑制剂,根据各种光谱数据推断他们为全反式取代的吡咯烷结构,绝对构型为(2S、3S、4S、5S)[4]。后来,本课题组[5]和其他课题组[6-8]分别采用不同的全合成方法纠正了 Radicamines A 和 B 的构型,确定其为(2R,3R,4R,5R)(图1)。我们采用相似的合成路线制备了天然产物 Radicamines A 和 B。本研究以拜糖平为阳性对照品,建立 α-葡萄糖苷酶抑制模型[9]和体外小肠外翻肠囊模型[10],旨在研究 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用和对小肠葡萄糖吸收的影响,为进一步研究体内降糖作用奠定基础。

[通信作者] 刘春艳,E-mail:tangshan2002@yahoo.cn

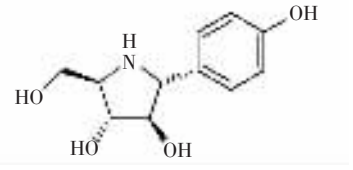
1 材料与方法

1.1 材料

Radicamine A(本课题组制备),α-葡萄糖苷酶(美国 Sigma 公司),4-硝基苯-α-D-吡喃葡萄糖苷(美国 Sigma 公司),拜糖平(唐山市医药公司),其余试剂均为国产分析纯试剂,Glu 血糖试剂盒;酶标仪;Wistar 大鼠[中国医科大学动物中心提供,合格证号为 SCXK(辽)2008-0011];大鼠离体肠营养液配制方法:大鼠离体肠营养液选用 Kreb's 缓冲液配制而成,其 pH 值为 7.4。



Radicamine A



Radicamine B

图1 Radicamines A 和 Radicamines B 的构型

1.2 方法

1.2.1 RadicamineA 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

1.2.1.1 α-葡萄糖苷酶抑制模型的建立 根据 Chapde/aine 等[9]的方法测定 α-葡萄糖苷酶活性,即以对硝基苯葡萄糖苷(4-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside, PNPG)为底物,0.1 mol/L Na_2CO_3 溶液为终止液,于 400 nm 处比色测定。其中酶活力单位定义为:在 37 ℃,pH 6.8 的条件下,1 min 内水解 PNPG 释放 1 mol 所需的酶量。抑制剂活力单位定义为:在相同的条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂量。

1.2.1.2 不同浓度的 RadicamineA 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用 取 5 mg/L 的拜糖平或 0、0.5、1、2、4、6、8 mg/L 的 Radicamine A,测定其对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性。

抑制率 =(抑制剂活力/酶活力)×100%

根据抑制率计算 Radicamine A 半数抑制浓度 IC_{50}。

1.2.2 Radicamine A 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用

1.2.2.1 翻转离体小肠囊腔的制作 参照文献[10]方法,实验大鼠禁食不禁水 24 h,处死,剖开腹腔,在十二指肠上端切开取出整段小肠,剪去约 10 cm 左右的十二指肠部分,余下肠段用 37 ℃的生理盐水冲洗内容物,小心地剥离肠系膜和脂肪,不能损伤肠壁,然后用 37 ℃的大鼠离体肠营养液洗干净后剪成 6 cm 等长的肠段。肠段一端节扎后,用灌胃针将肠段翻转使其粘膜面朝外,注入 1 ml 营养液后结扎另一端即可。

1.2.2.2 反应体系的优化 实验前分别对浓度、反应时间和阳性药物浓度条件进行筛选:底物蔗糖最适浓度为 0.8 mol/L,反应最佳时间为 90 min,对照品拜糖平最佳浓度为 0.5 mg/ml。

1.2.2.3 实验方法的建立 取实验大鼠 8 只,雌雄各半,按 1.2.2.1 所述方法制备离体小肠外翻肠囊,共取 40 截肠段,随机分为 Radicamine A 的 6 个剂量组(设组名为 A1 ~ A6)、拜糖平对照组、阴性对照组、空白组,每组 $n=4$。将各段肠囊分别放入等量的大鼠离体肠营养液中,加入蔗糖及拜糖平或 RadicamineA,37 ℃振荡水浴 90 min,取出肠囊内液体,用葡萄糖试剂盒在 490 nm 波长测吸光度值,计算药物对小肠葡萄糖吸收的抑制率,并根据抑制率计算 Radicamine A 半数抑制浓度 IC_{50}。

1.2.3 数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,本实验应用 SPSS 13.0 软件,各浓度药物组与空白组、阴性对照组、阳性对照组的比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用呈剂量依赖性增强(表 1)。经 t 检验,当浓度为 0.5 mg/L 时,抑制作用不显著($P>0.05$);当浓度增加到 1 mg/L 时,对小肠葡萄糖吸收有显著的抑制作用($P<0.05$);当浓度超过 2 mg/L 时,抑制作用非常显著($P<0.01$),Radicamine A 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 2.27 mg/L。阳性对照品拜糖平(5 mg/L)对 α-葡萄糖苷酶的抑制率为 69.2%,与 Radicamine A(4 mg/L)的抑制率 67.3% 无显著性差别($P>0.05$)。

表1 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

组别	抑制剂浓度(mg/L)	抑制率(%)
空白组	-	-
拜糖平对照组	5	69.2 ± 4.0[a]
Radicamine A		
A1	0.5	6.8 ± 2.0
A2	1	17.9 ± 6.0[b]
A3	2	39.5 ± 5.0[a]
A4	4	67.3 ± 4.0[a]
A5	6	86.6 ± 3.0[a]
A6	8	93.2 ± 6.0[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与空白组比较

2.2 Radicamine A 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用

不同浓度 Radicamine A 对离体大鼠小肠葡萄糖吸收的抑制作用见表 2。结果表明,随着 Radicamine A 浓度的不断增加,其抑制作用也呈剂量依赖性逐渐增强。经 t 检验,当浓度为 0.025 mg/ml 时,抑制作用不显著($P>0.05$);当浓度增加到 0.05 mg/ml 时,对糖吸收有显著的抑制作用($P<0.05$);当浓度超过 0.1 mg/ml 时,抑制作用极显著($P<0.01$);但当浓度由 0.4 mg/ml 增加到 0.8 mg/ml 时,Radicamine A 的抑制作用增强不明显($P>0.05$)。Radicamine A 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 0.101 mg/ml。以拜糖平为阳性对照,发现 0.4 mg/ml Radicam-

ine A 与 0.5 mg/ml 拜糖平对小肠葡萄糖吸收的抑制作用无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 Radicamine A 对小肠葡萄糖吸收的影响

组别	抑制剂浓度(mg/ml)	抑制率(%)
空白组	-	-
阴性对照组	-	-
拜糖平对照组	0.500	90.2±9.0[a]
Radicamine A		
A1	0.025	10.4±3.0
A2	0.050	34.7±4.0[b]
A3	0.100	52.9±3.0[a]
A4	0.200	73.6±8.0[a]
A5	0.400	88.6±6.0[a]
A6	0.800	89.5±5.0[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与空白组比较

3 讨论

目前,临床上通过抑制 α-葡萄糖苷酶的活性来治疗糖尿病的口服降糖药物即 α-葡萄糖苷酶抑制剂如拜糖平,已被第 3 次亚太地区糖尿病治疗药物指南推荐为餐后降血糖的一线药物[11-13]。本研究以拜糖平为阳性对照,研究 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用。结果显示 Radicamine A 对 α-葡萄糖苷酶抑制作用呈剂量依赖性,其 IC_{50} 为 2.27 mg/L,且与拜糖平无显著性差异,证实在体外 Radicamine A 与拜糖平对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用相似。

α-葡萄糖苷酶抑制剂通过抑制肠道黏膜细胞刷状缘葡萄糖苷酶来减少糖类的水解,延缓葡萄糖的吸收,从而有效降低糖尿患者餐后血糖浓度峰值,达到控制餐后血糖、治疗糖尿病的目的[14,15]。本研究选择的大鼠体外小肠外翻肠囊模型,用含有一系列浓度 α-葡萄糖苷酶抑制剂的孵育液来孵育肠囊,一定时间后测定囊内葡萄糖的含量,并计算抑制率。由于肠囊在孵育液中可以保持良好活性,那么其结果更接近体内实验。本研究结果显示 Radicamine A 能明显地抑制小肠对葡萄糖的吸收($P<0.01$),呈剂量依赖性,其 IC_{50} 为 0.10 mg/ml。说明 Radicamine A 是通过抑制 α-葡萄糖苷酶的活性来实现其对小肠葡萄糖吸收的抑制作用。结果还显示当 Radicamine A 增加到一定剂量时,其对小肠葡萄糖吸收的抑制作用增强不显著,这可能与 α-葡萄糖苷酶已经趋向饱和有关。我们还发现,Radicamine A 对小肠葡萄糖吸收的抑制作用与拜糖平无显著性差异,其有望成为一种治疗糖尿病的新型药物,进一步的体内降糖试验正在进行中。

参考文献:

[1] 黄元, 陈睿, 马继雄, 等. 高寒菊科植物提取物中 α-葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(6): 566-569
[2] 薛亚平, 陈小龙, 郑裕国. α-葡萄糖苷酶抑制剂类药物的研究与开发[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(8): 706-709.
[3] 李英, 沈忠明, 杨万山, 等. α-葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及其性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4):24-29.
[4] Shibano M, Tsukamoto D, Masuda A, *et al*. Two new pyrrolidine alkaloids, radicamines A and B, as inhibitors of alpha-glucosidase from Lobelia chinensis Lour [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2001, 49(10): 1362-1365.
[5] Liu C Y, Gao J C, Yang G, *et al*. Enantiospecific synthesis of (-)-radicamine B [J]. Lett Org Chem, 2007, 4(8): 556-558.
[6] Yu C Y, Huang M H. Radicamines A and B: synthesis and revision of the absolute configuration [J]. Org Lett, 2006, 8(14): 3021-3024.
[7] Tsou E L, Chen S Y, Yang M H, *et al*. Synthesis and biological evaluation of a 2-aryl polyhydroxylated pyrrolidine alkaloid-based library [J]. Bioorg. Med. Chem. 2008, 16(24): 10198-10204.
[8] Gurjar MK, Borhade RG, Puranik VG, *et al*. Total synthesis of -radicamine B. Tetrahedron Lett. 2006, 47(39): 6979-6981
[9] Chapdelaine P, Tremblay R R, Dube J Y. P-Nitrophenol-alpha-D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen [J]. Clin Chem, 1978, 24(2): 208-211.
[10] Racusen L C, Binder H J. Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat [J]. Gastroenterology, 1977, 73(4 Pt 1): 790-796.
[11] van-de-Laar F A, Lucassen P L, Akkermans R P, *et al*. alpha-Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis [J]. Diabetes Care, 2005, 28 (1): 154-163.
[12] Levetan C. Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes[J]. Curr Med Res Opin, 2007, 23(4): 945-952.
[13] 陈少明, 李培. 中药有效成分对 α-葡萄糖苷酶活性影响的研究[J]. 中国医药导报, 2007, 4(15): 92-93
[14] Itoh T, Kita N, Kurokawa Y, *et al*. Suppressive effect of a hot water extract of adzuki beans (Vigna angularis) on hyperglycemia after sucrose loading in mice and diabetic rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(12): 2421-2426.
[15] 许有瑞, 倪京满, 孟庆刚, 等. 甘草中 α-葡萄糖苷酶抑制剂的初步研究[J]. 中药材,2005, 28(10): 890-891.

(**收稿**:2009-08-22;**修回**:2009-11-04)
(编辑 邓强庭)